

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-504492

(P2001-504492A)

(43) 公表日 平成13年4月3日 (2001.4.3)

| (51) IntCl.      | 識別記号 | F I           | ページ数 (参考) |
|------------------|------|---------------|-----------|
| C 0 7 K 5/00     |      | C 0 7 K 5/00  |           |
|                  |      |               | 7/00      |
| // A 6 1 K 38/00 |      | A 6 1 P 7/04  |           |
| A 6 1 P 7/04     |      | A 6 1 K 37/02 |           |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁)

(21) 出願番号 特願平10-523818  
 (86) (22) 出願日 平成9年11月18日 (1997.11.18)  
 (85) 翻訳文提出日 平成11年5月19日 (1999.5.19)  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 7 / 2 1 0 7 5  
 (87) 国際公開番号 W O 9 8 / 2 2 1 2 5  
 (87) 国際公開日 平成10年5月28日 (1998.5.28)  
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 0 3 1 , 3 5 9  
 (32) 優先日 平成8年11月19日 (1996.11.19)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ブテナス、ザウリアス  
 アメリカ合衆国 05403 ヴァーモント州  
 サウス パーリントン オークウッド  
 ドライブ 76  
 (71) 出願人 マン、ケネス ジー  
 アメリカ合衆国 05458 ヴァーモント州  
 グランド アイル イースト ショーア  
 ロード サウス 72  
 (72) 発明者 ブテナス、ザウリアス  
 アメリカ合衆国 05403 ヴァーモント州  
 サウス パーリントン オークウッド  
 ドライブ 76  
 (74) 代理人 弁理士 三好 秀和 (外1名)

最終頁に続く

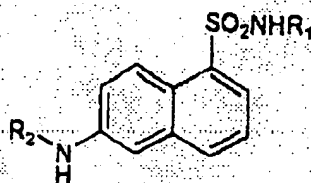
(54) 【発明の名称】 6-ペプチジルアミノ-1-ナフタレンスルホンアミド・モエッティを含むペプチドミメティック体

## (57) 【要約】

式 (I) に示す化合物、あるいは薬剤として受け入れ可能な無害の塩であって、 $R_1$  がベンジル基、あるいは式 (a) のペプチドであり、 $R_2$  と  $R_4$  は遊離あるいは保護アミノ酸側鎖を独立に表し、 $R_3$  はヒドロキシ、アルコキシ、ベンゾキシ、アミノ酸、あるいはペプチド残基であり、 $R_5$  はアミノ酸、あるいはペプチド残基である化合物が開示されており、この化合物は、酵素に対して高い特異性を持つ活性化されたタンパク質 C の阻害剤である。また、本発明は、式 (II) に示す化合物、あるいは薬剤として受け入れ可能な塩であって、 $R_2$  と  $R_4$  は遊離あるいは保護アミノ酸側鎖を独立に表し、 $R_3$  はヒドロキシ、アルコキシ、ベンゾキシ、アミノ酸、あるいはペプチド残基であり、 $R_5$  はスルホンアミド窒素原子を介してペプチド基に付加された 6-アミノナフタレンスルホンアミド、あるいは末端窒素原子を介してペプチド基に付加された遊離、あるいは保護のどちらかのアミノ基である化合物をも提供する。

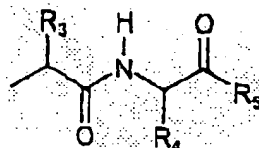
## 【特許請求の範囲】

## 1. 式



に示す化合物、あるいは薬剤として受け入れ可能な無害の塩であって、

$R_1$ がベンジル基、あるいは式



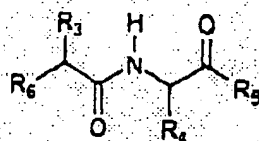
のペプチドであり、

$R_3$ と $R_4$ は、遊離あるいは保護アミノ酸側鎖を独立に表し、

$R_5$ は、ヒドロキシ、アルコキシ、ベンゾキシ、アミノ酸、あるいはペプチド残基であり、

$R_2$ はアミノ酸、あるいはペプチド残基である化合物。

## 2. 式



に示す化合物、あるいは薬剤として受け入れ可能な塩であって、

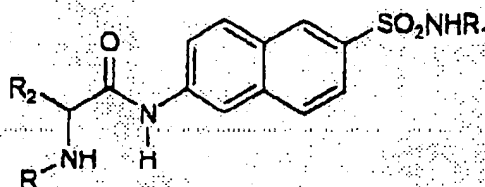
$R_3$ と $R_4$ は、遊離あるいは保護アミノ酸側鎖を独立に表し、

$R_5$ は、ヒドロキシ、アルコキシ、ベンゾキシ、アミノ酸、あるいはペプチド残基であり、

$R_6$ は、スルホンアミド窒素原子を介してペプチド基に付加された6-アミノナフタレンスルホンアミド、あるいは末端窒素原子を介してペプチド基に付加さ

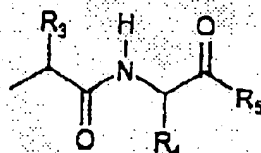
れた遊離、あるいは保護のどちらかのアミノ基である化合物。

### 3. 式



に示す化合物、あるいは薬剤として受け入れ可能な塩であって、

$R_1$ がベンジル基、あるいは式



のペプチドであり、

$R_3$ と $R_4$ は、遊離あるいは保護アミノ酸側鎖を独立に表し、

$R_5$ は、ヒドロキシ、アルコキシ、ベンゾキシ、アミノ酸、あるいはペプチド残基であり、

$R$ はアミノ酸、あるいはペプチド残基を表し、

$R_2$ は、L-アルギニン、D-アルギニン、ホモアルギニン、あるいは $\beta$ -ホモアルギニンの側鎖を表している化合物。

4.  $R_2$ は、L-、あるいはD-アルギニン、ホモアルギニン、あるいは $\beta$ -ホモアルギニンである請求項1に記載の化合物。

5.  $R_2$ は、カルボキシル末端でL-、あるいはD-アルギニン、ホモアルギニン、あるいは $\beta$ -ホモアルギニンを有するペプチドである請求項1に記載の化合物。

6. 下記から成る基から選択された化合物。

Lys-Lys-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz;  
Val-Leu-Harg-ANSN-Bz;  
Boc-Ser-Trp-Arg-Harg-ANSN-Ser-Glu(OBz);  
Boc-Val-Asp(Me)-Gln-Harg-ANSN-Glu-Ile-OBz;  
Boc-Leu-Asp(Me)-Arg-Harg-ANSN-Gln-Arg-OEt;  
LEU-Asp(Me)-Arg-Harg-ANSN-Gln-Arg-OEt;  
Pro-Glu-Leu-Harg-ANSN-Asn-Asn-OBz;  
Ile-Glu(OBz)-Pro-Harg-Asn-Ser-Glu-OBz;  
Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz;  
Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz;  
Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Boc)-Lys(Z)-OBz;  
Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OMe;  
Lys-Lys-Thr-Harg-ANSN-Bz;  
Lkys-Lys(Z)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-OBz;  
Lys(Z)-Lys(Z)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-OBz;  
Z-Lys-Lys-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz;  
Z-Lys-Lys-Thr-( $\beta$ -Harg)-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz;  
Z-Lys-Lys-Thr-(D-Arg)-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz;  
Z-Lys-Lys(Z)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz;  
Lys(Z)-Lys(Z)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz;  
Lys-Lys-Thr-Harg-ANSN-Lys-Lys(Z)-OBz;  
Lys-Lys-Thr-Harg-ANSN-Lys-Lys-OMe;  
ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz;  
H,N-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz;

Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-Thr-OH;

Phth-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz;

Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz;

Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-OH;

H<sub>2</sub>N-Lys(Z)-Lys(Z)-Thr-OH;

Z-Lys(Boc)-Lys(Z)-Thr(Bz)-OH;

ANSN-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>;

ANSN-Ser-Ser-OBz;

H<sub>2</sub>N-Ser-Ser-OBz;

ANSN-Glu-Ile-OBz;

ANSN-Asn-Asn-OBz;

ANSN-Ser-Glu-OBz; 及  $\bar{U}$

Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-Obz

## 【発明の詳細な説明】

6-ペプチジルアミノ-1-ナフタレンスルホンアミド・モエッティを含むペプチドミメティック体

## 発明の背景

## 発明の分野

本発明は概略的には合成ペプチド成分を含有する新規な化合物に関連するものである。より特定すると、本発明は基質が血液凝固過程のプロモータである活性化プロテインC (APC) に対する天然基質のペプチド凝症 (mimetics) に関連するものである。本発明はさらに抗凝血過程の阻害および血液中に於ける凝固過程の促進におけるこのような化合物の使用に関するものである。

## 関連技術の説明

活性化プロテインC (APC) は血液凝固および繊維素溶解に含まれるセリンプロテアーゼである。これは塩基性アミノ酸がscissile結合のカルボニル基を提供してペプチド、エステル、またはアミド結合を選択的に加水分解するプロテアーゼであるという意味でトリプシン様のものとして記述することができよう。インビボ (in vivo) における酵素の特異性は、目的とするリジンのアミノ基側およびカルボキシル基側または基質プロテインのアルギニン残基に配位する特定のアミノ酸鎖の結合領域をプロテアーゼ中に含んだ構造因子の多様な複合官能基

である。短いペプチド基質が種々のプロテアーゼから識別するための十分な情報を内包するように設計するというアイデアは各活性部位が唯一の側鎖結合ポケット列から構成されるという発想に基づいている。

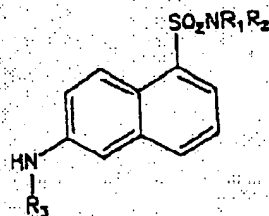
ローソンら (J. Biol. Chem. 267:48344843, 1992) は組織片や磷脂質の存在下または不存在下でVIIa因子の酵素活性を直接測定するために使用することが可能な蛍光基質 [6-(Mcs-D-Leu-Gly-Arg) アミノ-1-(ジメチル) ナフタレンスルホンアミド] について議論しており、これを本発明に取り入れて組み込んでいる。

ブテナスら (Biochem. 31:5399-5411, 1992) は、6-アミノ-1-ナフタレンスルホンアミドの合成について記述し、これらの化合物がプロテアーゼのペプチ

ド基質内の検出基として用いることができることを示唆しており、これを本発明に取り入れて組み込んでいる。

ブテナスら (Anal. Biochem. 225:231-241, 1995) は、APCの検出に有効な 6-アミノ-2-ナフトレンスルホンアミドおよび6-ペプチジル-2-アミノナフトレンスルホンアミドを内包するアミノナフトレンスルホンアミドおよびペプチルアミノナフトレンスルホンアミドの種々の異性体を議論しておりこれを本発明に取り入れて組み込んでいる。

米国特許第5399487号は、式：

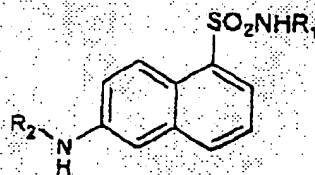


の化合物を開示している。ここで、 $R_1$ は水素、低アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アルキルシクロアルキル、シクロアルキルアルキルまたはフェニルアルキルである。 $R_2$ は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アルキルシクロアルキル、シクロアルキルアルキルまたはフェニルアルキルである。また $NR_1R_2$ は窒素ヘテロサイクルを形成し、 $R_3$ は水素、アミノ酸またはペプチド残基である。

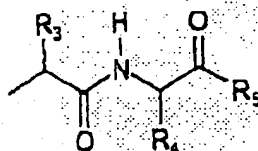
これらの化合物はタンパク質加水分解酵素の活性度を決定するためのアッセイの基質としてあるいは酵素阻害剤としての官能基といえる。

#### 発明の概要

本発明は式 I :



の化合物あるいはその薬剤学的に受容可能な塩を提供する。ここで $R_1$ は式

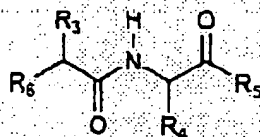


I

で表されるベンジル基またはペプチドである。また  $R_3$  および  $R_4$  はフリーのまたは保護されたアミノ酸側鎖であり、 $R_5$  は水酸基、アルコキシ、ベンゾキシおよびアミノ酸またはペプチド残基であり、 $R_2$  はアミノ酸またはペプチド残基である。

式 I の化合物はこの特定の酵素に高い特異性を有する APC 阻害剤を提供する。

本発明はまた式 II :



II

で表される化合物またはその薬剂的に受容可能な塩を提供する。ここで、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  は式 I と同じである。そして  $R_6$  はスルホンアミドの窒素原子を介してペプ

チド基に結合した 6-アミノナフタレンスルホンアミドまたは末端の窒素原子を介してペプチド基に結合したフリーのあるいは保護されたアミノ基である。

式 I および II の化合物は組織因子 (組織トロンボプラスチン) 経路阻害剤 (TFPI) によって凝固因子 VIIa および Xa の阻害から保護する。これらの化合物はまた血液凝固のインビトロ (in vitro) 再構成モデルにおいてトロンビン生成速度を促進する。

本発明は血液凝固のプロモータを提供するものである。

式 I および II の化合物は血液中の抗凝血過程の高い選択性をもつ阻害剤である。

。プリ凝血剤の活性度は部分的には抗凝血剤の経路阻害に依存する。抗トロンビ



ンIII、APCおよびTFPIは血液凝固を反対の傾向で制御する。式Iの化合物はこの酵素に結合して高い活性を有するAPCの阻害剤として使用できるが加水分解の速度が遅くまたは全く分解されない。結論として、本発明は血液中の抗凝固過程を妨害または阻害するための有用な化合物を提供するものである。さらに、これらの化合物は血液凝固のインビトロ再構成モデルにおけるプロトロンビンの活性度を加速するものである。これら3つの効果をまとめると、式IおよびIIの化合物は正常、VIII因子欠陥、およびIX因子欠陥の血漿の血塊時間を減少させるのである。また全血の場合も同様である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、抑制剤濃度と基質の加水分解の割合との関係

を示す図であり、APC用の混合物の抑制定数 ( $K_i$ ) の結果を示している。この分析では、原色体基体スペクトロジームTHの異なる3種類の濃度 (100、200、及び600  $\mu$ M) が使用された。

図2は、因子VIIa/組織因子が0.5 pMで始められたときの時間とトロビンの発生との関係を示す図である。白丸は、存在する全ての凝固したタンパク質を示す；黒丸は、存在する全ての凝固したタンパク質、タンパク質C (PC)、及びトロンボモジュリン (Tm) を示す；白三角は、存在する全ての凝固したタンパク質、PC、Tm、及び化合物#9を示す；黒三角は、存在する全ての凝固したタンパク質、PC、Tm、及び化合物#1を示す。

図3は、因子VIIa/組織因子が1.25 pMで始められたときの時間とトロビンの発生との関係を示す図である。黒四角は、存在する全ての凝固したタンパク質、PC、及びTmを示す；白四角は、存在する全ての凝固したタンパク質、PC、及びTmを示す、因子VIIIは存在しない；白ダイヤモンド形は、存在する全ての凝固したタンパク質、PC、Tm、及び化合物#1を示す、因子VIIIは存在しない；黒ダイヤモンド形は、存在する全ての凝固したタンパク質、PC、Tm、及び化合物#9を示す、因子VIIIは存在しない。

図4は、化合物#1及び#9の濃度に対する因子VIIa/組織因子活性度の関係を示す図である。白四角は、存

存在する因子VIIa/組織因子及び化合物# 9を示す；黒四角は、存在する因子VIIa/組織因子、及び化合物# 1を示す；白丸は、存在する因子VIIa/組織因子、化合物# 9、及び組織因子経路抑制剤（TFPI）を示す；黒丸は、存在する因子VIIa/組織因子、化合物# 1、及びTFPIを示す。

図5は、化合物# 1及び# 9の濃度に対する因子Xa活性度の関係を示した図である。白丸は、存在する因子Xa及び化合物# 9を示す；黒四角は、存在する因子Xa及び化合物# 1を示す；白丸は、存在する因子Xa、化合物# 9、及びTFPIを示す；黒丸は、存在する因子Xa、化合物# 1、及びTFPIを示す。

図6は、因子VIIa/組織因子が1. 25 pMで始められたときの時間とトロピンの発生との関係を示す図である。白丸は、存在する全ての凝固したタンパク質及びTFPIを示す；黒丸は、存在する全ての凝固したタンパク質、及びTFPIを示す、因子VIIIは存在しない；白三角は、存在する全ての凝固したタンパク質、TFPI、及び化合物# 9を示す、因子VIIIは存在しない；黒三角は、存在する全ての凝固したタンパク質、TFPI、及び化合物# 1を示す、因子VIIIは存在しない。

図7は、因子VIIa/組織因子が1. 25 pMで始められたときの時間とトロピンの発生との関係を示す図である。白丸は、存在する全ての凝固したタンパク質、PC、Tm、及びTFPIを示す；黒丸は、存在する全ての凝

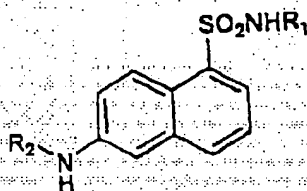
固したタンパク質、PC、Tm、及びTFPIを示す、因子VIIIは存在しない；白三角は、存在する全ての凝固したタンパク質、PC、Tm、TFPI、及び化合物# 9を示す、因子VIIIは存在しない；黒三角は、存在する全ての凝固したタンパク質、PC、Tm、TFPI、及び化合物# 1を示す、因子VIIIは存在しない；四角は、存在する全ての凝固したタンパク質、PC、Tm、TFPI、及び化合物# 1及び# 9を示す、因子VIIIは存在しない。

図8は、因子VIIa/組織因子が1. 25 pMで始められたときの時間とトロピンの発生との関係を示す図である。白丸は、存在する全ての凝固したタンパク質を示す；黒丸は、存在する全ての凝固したタンパク質及び化合物# 1を示す；三角は、存在する全ての凝固したタンパク質及び化合物# 9を示す；四角は、存

在する全ての凝固したタンパク質及び化合物# 26を示す。

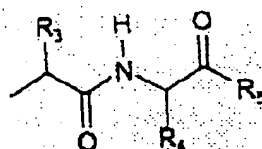
### 発明の詳細な説明

本発明は、式 I の化合物を提供する：



又は薬学的に許容できる毒性のないその塩を提供する；

ここで、R<sub>1</sub>は、ベンジル基又は次式のペプチドである

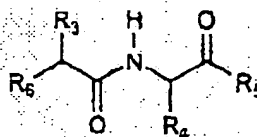


ここでR<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>は、自由な又は保護されたアミノ酸の側鎖を表し、R<sub>5</sub>は、水酸基、アルコキシ基、ベンゾルオキシ、及びアミノ酸又はペプチド残基を表している；そして

R<sub>2</sub>は、アミノ酸又はペプチド残基である。

式 I の化合物は、この特定の酵素に対し高い特異性を有するAPC反応抑制剤を提供する。

本発明は、式IIの化合物



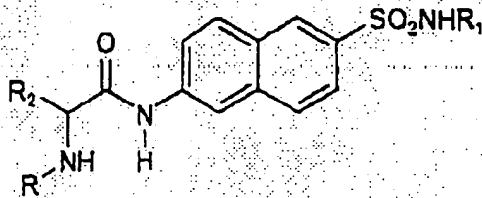
又は薬学的に許容できるその塩をも提供する。ここで

R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>は、式 I におけるのと同じであり；そして

R<sub>6</sub>は、スルホンアミド窒素原子を介してペプチド基に

取り付けられた6-アミノナフタレンスルホンアミド又は終端の窒素原子を介してペプチド基に取り付けられた自由又は保護されたアミノ基である。

本発明は、式IIIの化合物をも提供する



ここで、

$R_1$ は、上記において式Iに定義されたのと同じである；

$R$ は、アミノ酸又はペプチド残基を表す；そして

$R_2$ は、L-アルギン、D-アルギン、ホモアルギン又は $\beta$ -ホモアルギンからなる側鎖を表す。

本発明の典型的な化合物は、これは式Iによって包含されているが、それらの毒性がなく薬学的に許容できる塩を含む。

毒性がなく薬学的に許容できる塩は、例えば塩化水素酸、磷酸、臭化水素酸、硫酸、スルフィン酸、蟻酸、トルエン酸、スルホン酸、ヨウ化水素酸、酢酸、トリフルオル酢酸又は類似の酸の塩を含む。当業者は、幅広い種類の毒性がなく薬学的に許容できる他の塩を認めるであ

ろう。

本発明の化合物は、本技術分野で既知のあらゆる種類の合成方法の他、米国特許5,399,487号公報に記載された方法を用いて、比較的高い収率で適当に合成される。米国特許5,399,487号公報は、言及することによりそっくりそのままここに導入されたものとする。

ペプチド残基は、例えば $\alpha$ -ペプチドボンドによって結合された少なくとも2つのアミノ酸を含む基を意味する。本発明のペプチド残基は、現存する天然産物のタンパク質分解過程、ブロック化されるアミノ酸の化学合成、又は試験管内のセルを用いた分子生物学的アプローチにより得ることができる。アミノ酸、又はペプチド残基の調製で使用されたアミノ酸は、自然に又は人工的に生じたアミノ酸

のいずれでもよい。ペプチド残基は、随意に、種々のアミノ又はカルボキシル保護基を含むことであってもよい。代表的な保護基は、“BOC”基、すなわち、*t*-ブトキシカルボニル、“Z”基、すなわち、ベンジルオキシカルボニル、“FMOC”基、すなわち、フルオレニルメトキシカルボニル、“Bz”基、すなわち、ベンジル、“Et”基、すなわち、エチル、“Me”基、すなわち、メチル、及び“Bzl”基、すなわち、ベンゾイルである。

タンパク質分解酵素用の反応抑制剤は、セリンプロテアーゼに対し高い親和力で相互作用し、酵素の活性化した領域をブロックする式Iの化合物を意味する。

アミノ酸側鎖は、アミノ酸カルボキシル基に対するアルファカーボン上の置換基を意味する。

血管の損傷の結果として内皮下から誘導された組織因子がさらされ、プラズマセリンプロテアーゼ、因子VIIa、と酵素錯体を形成したときに血液凝固のカスケードの引き金が引かれる。因子VIIa/組織因子錯体は、因子X及び因子IXを酵素因子Xa及び因子IXaに活性化する。その補足因子、因子VIIIa、とともに錯体中にある因子IXaは、因子VIIa/組織因子錯体よりも約50倍高い割合で因子Xを活性化する。次に、因子Xaは、因子VIIを活性化し、さらに因子IX及び因子Xの活性を高める。因子Xaの主な役割は、因子Vaとともにプロトビナーゼ錯体、及び、プロトロンビンをトロンビンへの活性化に導くリン脂質膜面を形成することである。トロンビンは、溶解性のフィブリノーゲンに付着し、フィブリンを形成する。フィブリンは、重合し、非溶解性の血塊を形成する。血液凝固カスケードは、血液凝固の天然抑制剤、組織因子経路抑制剤(TFPI)、活性化されたタンパク質C(APC)及び抗トロンビンIII(AT-III)、によって抑制される。

血液凝結連鎖の本質的補助因子であるV(a)とVIII(a)は、表1に示したサイトに開裂している。これら開裂の結果として補助因子の機能は失われる。TFPIは凝結タンパク因子VIIaとXaを抑制する。

表1

A.P.C天然基質開裂サイトのシーケンス

| シーケンス<br>サイト | 基質 | 開裂 |
|--------------|----|----|
|--------------|----|----|

|    |                                       |                   |                    |
|----|---------------------------------------|-------------------|--------------------|
|    | $P_4-P_3-P_2-P_1-P_1'-P_3'-P_2'-P_1'$ |                   |                    |
| 1. | -Lys-Lys-Thr-Arg-Asn-Pro-Lys-Lys-     | factor V/Va       | Arg <sup>306</sup> |
| 2. | -Leu-Asp-Arg-Arg-Gly-Ile-Gln-Arg-     | factor V/Va       | Arg <sup>306</sup> |
| 3. | -Met-Ala-Thr-Arg-Lys-Met-His-Asp-     | factor V/Va       | Arg <sup>478</sup> |
| 4. | -Arg-Leu-Lys-Lys-Ser-Gln-Phe-Leu-     | factor V          | Arg <sup>594</sup> |
| 5. | -Pro-Gln-Leu-Arg-Met-Lys-Asn-Asn-     | factor VIII/VIIIa | Arg <sup>316</sup> |
| 6. | -Val-Asp-Gln-Arg-Gly-Asn-Gln-Ile-     | factor VIII/VIIIa | Arg <sup>342</sup> |
| 7. | -Ile-Glu-Pro-Arg-Ser-Phe-Ser-Gln-     | factor VIII       | Arg <sup>740</sup> |

A P C を特定の抑制でき、かつ T F P I の作用を抑えることのできるいかなる化合物も、血友病 A と血友病 B の治療に役立つであろう。

式 I 及び II の化合物は、A P C（実施例 2 及び 3 を見よ）に対して高度に選択的な抑制剤である。式 I、II 及び III の化合物は、凝結タンパクを T F P I（実施例 3 を見よ）による不活性化から保護することができるし、血液凝結の再構築インビトロモデル（実施例 4 を見よ）においてトロンビンの生成を促進することができる。本

発明の化合物は、A P C を抑制し、T F P I を不活性化し、血液凝結連鎖を促進するために用いることができる。そのような化合物は、競合する、特定の A P C 抑制剤として働き、天然基質因子 V (a) と VIII (a) とともにこのプロテアーゼの反応速度を低減するであろう。このようにしてこれらの化合物は、インヴィヴォ／インヴィトロいずれにおいても、これらの酵素の天然タンパク分解活動を低減するであろう。これらの化合物は、VII a 因子と X a 因子が T F P I によって抑制を受けることから守る働きもする。これらは、トロンビン生成の加速化によって血液凝血プロセスを促進する。

6-アミノアシル結合の加水分解速度が遅い（この系統の他の化合物の加水分解速度と比較して）化合物は、抑制剤として特に有用である。本発明の与えられた化合物が効果を有し、酵素の特定の抑制剤となるか否かは、抑制定数を測定す

ることによって簡単に判断することができる。例えば、Alan Fershr, Enzyme St

Structure and Mechanism, W.H. Freeman and Company, New York, 1985を参照されたい。この記載内容は、これらの結合パラメータ測定技術の議論のために、ここに引例として取り込むこととする。

式 I から III の化合物の総合的効果は、凝結分析 (clotting assay) 或いは全血液凝結分析 (whole blood coagulation analysis) にて、血液凝結の再構築モデル [J. H. Lawson らの J. Biol. Chem. 269, 23357-23366 (1994)] におい

て判断することができる (Rand らの blood 88, 3432-3445 (1996))。

本発明のこれらの側面の全ては、前記した反応に起因する凝血速度増加の恩恵を受けうる患者へのこの化合物の投与によって実施化することができる。この化合物は、血小板作用 (動脈) とトロンビン作用 (静脈) の両方の凝血プロセスを含めて、先天的、後天的な血友病や機械的な外傷など、既存の他の薬物療法でトロンビンの活度を高めることによって改善しうる疾病乃至疾患の治療において特に有用である。

生体外で用いられるときも、この組成物は同様に、現在入手可能な他の凝血源の代わりに利用される。

式 I、II、III の化合物は、口から、局所において、或いは非経口的に、吸入、噴霧、又は直腸において、従来の無毒性の製薬として受け入れられるキャリア、助剤、媒体を含有した投薬単位構成によって、投与されることができる。ここで“非経口的”との語は、皮下注射、静脈注射、筋肉注射、胸骨部内注射、或いは注入技術 (infusion techniques) などを含む。さらに、式 I、II、III の化合物と、製薬として受け入れられるキャリアから成る、製薬構成も与えられる。式 I、II の一又はそれ以上の化合物は、一又はそれ以上の、無毒性で、製薬的に受け入れられるキャリア及び/又は希釈剤及び/又は助剤、さらに所望により他の活性成分とともに存在することができる。式 I、II、III の化合物を含む製薬組成物は、口内

使用に適した形状であることができる。例えば、錠剤、トローチ、菱形錠剤、水系又は油系懸濁液、分散可能粉末、或いは顆粒、エマルジョン、硬質又は軟質カ

プセル、或いはシロップ、エリキシルであることができる。

口内使用を意図した組成物は、製薬組成物の製造技術の分野において知られた如何なる方法に従っても調製されることができる。そのような組成物は、製薬として上質であって味の良いものを与えるために、甘味剤、香料、着色材、防腐剤からなるグループより選択される一又はそれ以上の助剤を含んでもよい。錠剤は、錠剤の製造に適した、無毒性で、製薬として受け入れられる補形薬との混合物の形で、その活性成分を含有するのである。これらの補形薬は、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム、燐酸ナトリウムなどの不活性希釈剤、コーンスターチ、アルギン酸などの粒状化、粉碎した助剤、スターチ、ゲラチン、アカシアなどの結合剤、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、タルクなどの潤滑剤であることができる。

錠剤は、塗布が施されていないものでもよいが、胃腸内において分解、吸収を遅延させるために、公知の手法によってコーティングが施されてあってもよい。コーティングによって、より長時間にわたって効果を維持できる。例えば、グリセリルモノステレート、グリセリルジステレートなどの遅延材料を用いることができる。

口内使用のための調剤例としては、活性成分が炭酸カ

ルシウム、リン酸カルシウム、カオリンなどの不活性固体希釈剤と混合された硬質ゲラチンカプセルとして、或いは、活性成分が水又はピーナッツ油、液体パラフィン、オリーブ油などの油系媒体と混合された軟質ゲラチンカプセルとして与えられることができる。

水系懸濁液は、水系懸濁液を作るのに適した補形薬と混合した形でその活性材料分を含む。そのような補形薬は沈殿防止剤であって、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム塩、メチルセルロース、ハイドロプロビルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム、アカシアゴムなどである。分散剤或いは湿潤剤は、天然に存在する磷脂質であることができる。例えば、レシチン、すなわちアルキレンオキサイドの脂肪酸との縮合物である。また例えば、ポリオキシエチレンステアリン酸エステル、すなわちエ



チレンオキサイドの長鎖脂肪族アルコールとの縮合物である。また例えば、ヘプタデカエチレンオキシタノール(oxyctanol)、すなわちエチレンオキサイドの脂肪酸から誘導される部分エステルとの縮合物である。また例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレイン酸エステルなどのヘキシトール、すなわちエチレンオキサイドと脂肪酸から誘導される部分エステルとの縮合物、及びヘキシトール無水物である。また例えば、ポリエチレンソルビトールモノオレイン酸エステルである。水系懸濁液はまた、一又はそれ以上の防腐剤を含んでいて

もよい。例えば、エチル又はn-プロピル p-ヒドロキシベンゾネート、一又はそれ以上の着色剤、一又はそれ以上の香料、サッカロース、サッカリンなどの一又はそれ以上の甘味剤などを含んでいてもよい。

油系懸濁液は、落花生油、オリーブ油、ゴマ油、或いはココナツ油などの植物油中、或いは液体パラフィンなどの鉱油中に活性成分を懸濁することによって調合される。油系懸濁液は、蜜ろう、硬質パラフィン、セチルアルコールなどの濃化剤を含んでいてもよい。上で列挙したような甘味剤、香料も、味の良い口内用調製物を与えるために添加することができる。これらの組成物は、アスコルビン酸などの酸化防止剤を添加することによって保存されることができる。

調整に適した分散可能な粉末及び微粒子、又は水の添加による水性懸濁液により、活性成分を、分散又は湿潤剤と、懸濁剤と、一又はそれ以上の種類の保存剤との混合物とする。適切な分散又は湿潤剤、及び懸濁剤は、既に、上述した通りものにより例示される。追加の賦形剤、例えば、甘味料、香料及び着色剤を加えてもよい。

本発明の医薬組成物を、水中油型エマルジョンの形態としてもよい。油相は、植物油、例えばオリーブ油又はアラキス油、又は鉱物油、例えば液体パラフィン又はこれらの混合物であってよい。適切な乳化剤は、天然発生ガム、例えばガムアカシア又はガムトラガカント、天然発生ホスファチド、例えば大豆油、レシチン、及び脂肪

酸及びヘキシトール無水から誘導される部分エステル誘導体エステル又は部分エ

ステル、例えばソルビタンモノオレエート、及び前記部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートであってもよい。エマルジョンは甘味料及び香料を含んでもよい。

シロップ及びエリキシルは、甘味料、例えばグリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール又はスクロースと共に調合してもよい。本医薬組成物は、無菌注射用の水性又は油性の懸濁液としてもよい。この懸濁液は、上記の適切な分散又は湿润剤及び懸濁剤を用いて公知の技術により調合してもよい。無菌注射の調合は、無毒の経口許容の希釈剤又は溶媒中の無菌注射溶液又は懸濁液、例えば1, 3-ブタンジオール中の溶液としてもよい。許容される賦形剤及び溶媒の中でも、水、リンガー溶液及び等張食塩水を使用することができる。さらに、無菌の固定油は、従来から、溶媒又は懸濁媒体として使用される。本目的のために、合成モノー又はジグリセリドを含む不揮発性の固定油の、どれを使用してもよい。さらに、オレイン酸のような脂肪酸を使用した注射用の調合への使用が見出された。

式I、II及びIIIの化合物は、薬物を直腸投与するための坐薬の形態で投与してもよい。これらの化合物は、薬物を適切な非刺激性の賦形剤と混合することにより調合してもよく、非刺激性の賦形剤は常温で固体であるが、

直腸内温度では液体であるため、薬物を放出する直腸内において溶解する。これらの材料は、ココアバター及びポリエチレングリコールである。

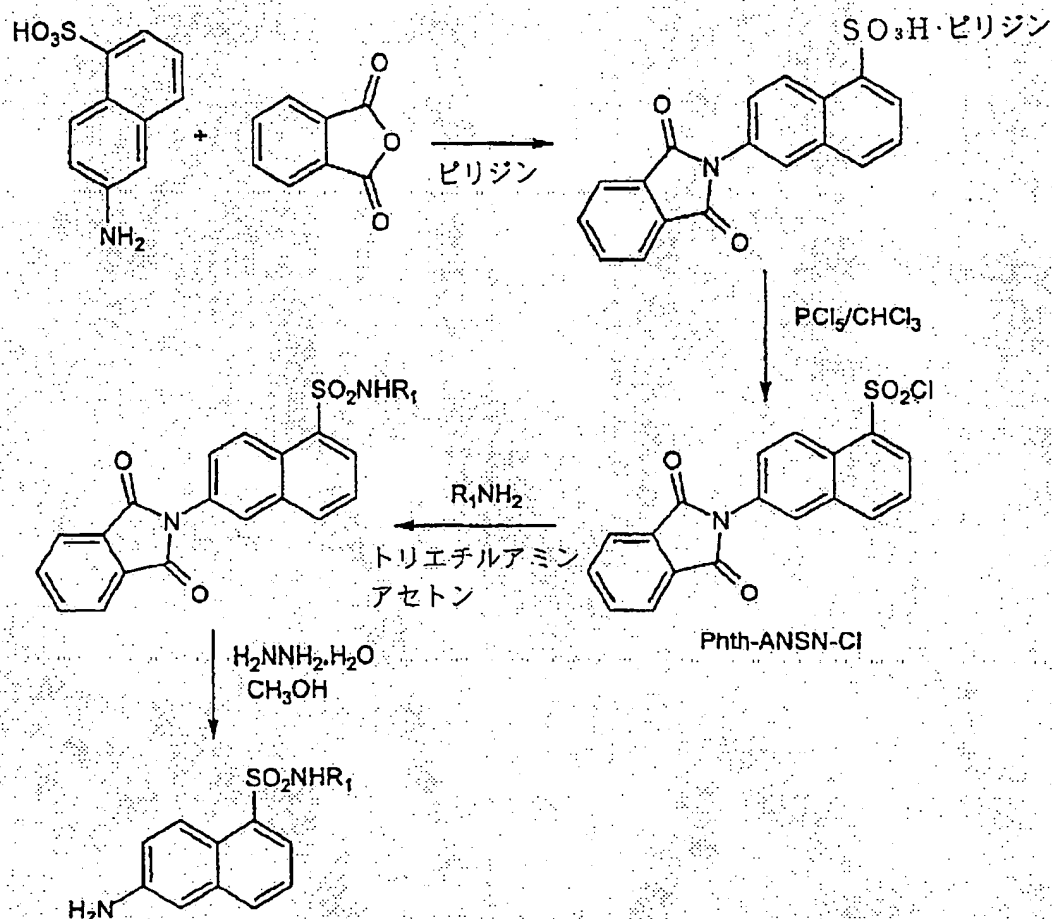
式I及びIIの化合物は、無菌媒体内において経口にて投与してもよい。本薬物は、使用する賦形剤及び濃度に依存して、賦形剤内で懸濁又は溶解させてよい。好ましくは、局所麻酔、保存剤及び緩衝剤の様な補助剤を賦形剤に溶解することができる。

投与レベルは一日に体重kgあたり約0.1mgから約140mgのオーダーが、上記の状態（一日に患者あたり約0.5mg又は7g）の治療において有用である。キャリア物質と組み合わせて単一の投与形態を形成する活性成分の量は、患者及び特定の投与形態に依存して異なる。投与単位の形態は、一般に約1mgから約500mgの活性成分を含むであろう。

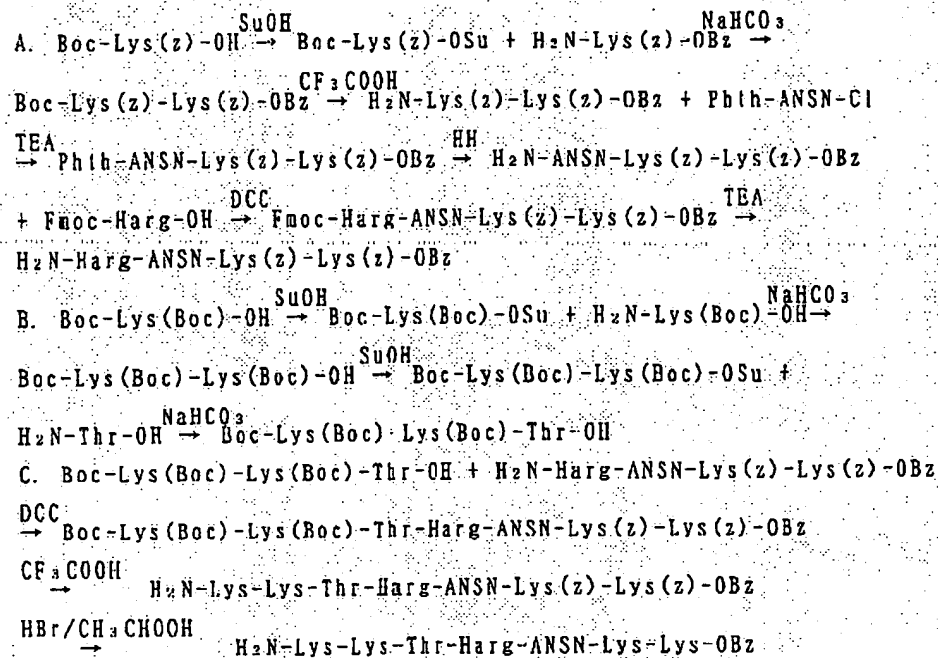
しかしながら、個々の患者に対する特定の投与レベルは、使用する特定化合物の活性、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与時間、投与経路及び排泄率を含めた種々のファクターに依存する。

本発明の化合物の合成の例は、スキーム I 及び II に示す化合物 24 (実施例 1) に基づいて示される。当業者であれば、次の実施例で示す様に、出発物質を変更してもよく、化合物を生成するため用いられる追加の工程が本願発明に含まれることが理解できよう。

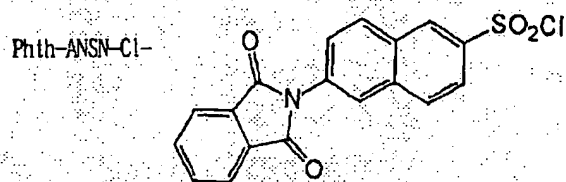
スキーム I



スキーム II



ここで、



SuOH — N-ヒドロキシサクシンイミド

DCC — 1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド

TEA — トリエチルアミン

HH — ヒドラジン モノヒドレート

本明細書において開示された、特許を含めた全ての記載及び参考文献は、参考文献としてここに組み込まれる。

本願発明は、記載された特定の化合物及び手順に発明の範囲及び精神が制限されることなく構成された次の実施例により、さらに説明される。

#### 実施例 1

ペプチドは、アンダーソン、G.W.、ツィーママン、J.E. 及びカラハン、F.H. (

1964年) ジャーナルオブケミカルソサエティ 8.6巻 1.8.3.9~1.8.4.2頁(A

沈殿した1, 3-ジシクロヘキシルウレア(DCU)を濾別し、濾液は溶剤留去して乾燥した。ジーBoc-リジンのスクシンイミドエステルはインプロパノール／ヘキサンから結晶化した。このエステルは、乾燥1, 4-ジオキサンの溶解し、等分子量の $\text{H}_2\text{N-Lys(Boc)-ONa}$ 及び $\text{NaHCO}_3$ の水溶液に加えた。反応混合物は室温で終夜維持し、1, 4-ジオキサンを留去し、残渣溶液は濃HClでpH2の酸性にした。沈殿したBoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OHは濾別し、水で洗浄して乾燥した。このジペプチドは、乾燥1, 4-ジオキサンの溶解し、等分子量のN-ヒドロキシスクシンイミドを添加し、溶液は4℃に冷却して、等分子量のDCCを加えた。反応混合物は4℃で終夜維持し、沈殿したDCUを濾別し、濾液は溶剤留去して乾燥した。スタシンイミドエステルBoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OSuはインプロパノール／ヘキサンから結晶化した。このエステルは、乾燥1, 4-ジオキサンに溶解して等分子量の $\text{H}_2\text{N-Thr-ONa}$ 及び $\text{NaHCO}_3$ の水溶液に加えた。反応混合物は室温で終夜維持し、1, 4-ジオキサンを留去し、残渣溶液は濃HClでpH2の酸性にした。沈殿したBoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Boc)-OHは濾別し、水で洗浄して乾燥した。

c)  $-Thr-OH$ は濾別し、水で洗浄して乾燥した。

B.  $Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz$  塩酸塩の合成

ジペプチド  $Boc-Lys(Z)$

$-Lys(Z)-OB$ 及び $Boc-Lys(Z)-OH$ のスクシンイミドエステルは、パートAで記載したように調製した。ジペプチドは、トリフルオロ酢酸に溶解し、溶液は室温で1時間放置し、乾燥ジエチルエーテルに投入した。沈殿した $H_2N-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz$ トリフルオロアセテートは濾別し、ジエチルエーテルで洗浄して乾燥した。このジペプチドは、アセトンに溶解し、2倍等量のトリエチルアミン及び等量の6-フタルイミド-2-ナフタレンスルホンクロリドを加えた。反応混合物は、室温で8時間維持し、アセトンを留去し、残渣は水で処理した。沈殿したフタルイミド- $ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz$ は濾別し、水で洗浄し、乾燥した。この化合物は、メタノールに溶解し、溶液は加熱して沸騰させ、2倍等量のヒドラジンヒドレートを添加した。反応混合物は室温で16時間維持し、沈殿したフタルヒドラジドを濾別し、濾液は溶剤留去して乾燥した。 $ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz$ はメタノールから結晶化し、濾過し、乾燥して次の行程で用いた。この化合物及び等分子量の $Fmoc-Harg-OH$ 塩酸塩を乾燥ピリジンに溶解し、 $-20^{\circ}C$ に冷却して、等分子量のDCCを添加した。反応混合物は $-20^{\circ}C$ で0.5時間、 $4^{\circ}C$ で2時間、そして室温で16時間維持した。沈殿したDCUは濾過し、ピリジンを留去し、残渣油分は $CHCl_3-PrOH(3:1)$ に溶解した。この溶液は水、2N塩酸、2%

$N_4HOH$ 及び再度水で洗浄し、無水 $Na_2SO_4$ を用いて乾燥し、溶剤留去して乾燥した。 $Fmoc-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz$ 塩酸塩はイソプロパノールから結晶化した。この化合物はジメチルホルムアミド(DMA)に溶解し、過剰のトリエチルアミンを加え、反応混合物は室温で終夜維持した。DMAを留去し、乾燥ジエチルエーテルを用いて $Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz$ 塩酸塩を沈殿させた。

C. H-Lys-Lys-Thr-Harg-ANSN-Lys-Lys-O

Hの合成。等分子量のBoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr-OH及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾールをDMF Aに溶解し、溶液は-20℃に冷却し、等分子量のDCCを加えた。反応混合物は、4℃で1時間維持した。等分子量のHarg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz塩酸塩のDMF A溶液を加え、反応混合物は、4℃で1.5時間、そして室温で17時間維持した。沈澱したDCUは濾別し、溶剤を留去し、残渣油分はn-ブタノール-酢酸エチル(1:1)に溶解した。この溶液は、5%NaHCO<sub>3</sub>、10%KHSO<sub>4</sub>及び水で洗浄した。有機溶液を濃縮し、乾燥ジエチルエーテルを用いてBoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBzを沈澱させた。乾燥した生成物は、ピリジウムポリ

ヒドロゲンフルオリドに溶解し、アニソールを加え、溶液を室温で1時間放置した。HF及びピリジンを留去し、残渣を0.2N酢酸で処理した。沈澱したクロードのH-Lys-Lys-Thr-Harg-ANSN-Lys-Lys-OH六酢酸塩を濾別し、水で洗浄して乾燥した。

合成した化合物の精製は、クロマトグラフィにより、セファデックス(Sephadex) LH-20カラム(1×100cm)上で溶離液としてメタノールを用いて行った。

上記の手順により実質的に以下の化合物が合成された。

|             |   |
|-------------|---|
| Compound 1  | Lys-Lys-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz                   |
| Compound 2  | Val-Leu-Harg-ANSN-Bz                                      |
| Compound 3  | Boc-Ser-Trp-Arg-Harg-ANSN-Ser-Glu(OBz) <sub>2</sub>       |
| Compound 4  | Boc-Val-Asp(Me)-Gln-Harg-ANSN-Glu-Ile-OBz                 |
| Compound 5  | Boc-Leu-Asp(Me)-Arg-Harg-ANSN-Gln-Arg-OEt                 |
| Compound 6  | Leu-Asp(Me)-Arg-Harg-ANSN-Gln-Arg-OEt                     |
| Compound 7  | Pro-Glu-Leu-Harg-ANSN-Asn-Asn-OBz                         |
| Compound 8  | He-Glu(OBz)-Pro-Harg-Asn-Ser-Gln-OBz                      |
| Compound 9  | Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz                               |
| Compound 10 | Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz     |
| Compound 11 | Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Boc)-Lys(Z)-OBz   |
| Compound 12 | Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OMe |
| Compound 13 | Lys-Lys-Thr-Harg-ANSN-Bz                                  |
| Compound 14 | Lys-Lys(Z)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-OBz                       |
| Compound 15 | Lys(Z)-Lys(Z)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-OBz                    |
| Compound 16 | Z-Lys-Lys-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz                 |
| Compound 17 | Z-Lys-Lys-Thr-( $\beta$ -Harg)-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz     |
| Compound 18 | Z-Lys-Lys-Thr-(D-Arg)-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz              |
| Compound 19 | Z-Lys-Lys(Z)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz              |
| Compound 20 | Lys(Z)-Lys(Z)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz             |
| Compound 21 | Z-Lys-Lys-Thr(OBz)-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz            |



|             |  |
|-------------|--|
| Compound 22 | Lys-Lys-Thr-Harg-ANSN-Lys-Lys(Z)-OBz               |
| Compound 23 | Lys-Lys-Thr-Harg-ANSN-Lys-Lys-OMe                  |
| Compound 24 | Lys-Lys-Thr-Harg-ANSN-Lys-Lys-OBz                  |
| Compound 25 | ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz                             |
| Compound 26 | H <sub>2</sub> N-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz                 |
| Compound 27 | Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-Thr-OH                           |
| Compound 28 | Phth-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz                        |
| Compound 29 | Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz                              |
| Compound 30 | Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-OH                               |
| Compound 31 | H <sub>2</sub> N-Lys(Z)-Lys(Z)-Thr-OH              |
| Compound 32 | Z-Lys(Boc)-Lys(Z)-Thr(Bz)-OH                       |
| Compound 33 | ANSN-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> |
| Compound 34 | ANSN-Ser-Ser-OBz                                   |
| Compound 35 | H <sub>2</sub> N-Ser-Ser-OBz                       |
| Compound 36 | ANSN-Gln-Ile-OBz                                   |
| Compound 37 | ANSN-Asn-Asn-OBz                                   |
| Compound 38 | ANSN-Ser-Glu-OBz                                   |
| Compound 39 | Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-Thr-Harg-ANSN-Lys(Z)-Lys(Z)-OBz  |

発明の好ましい化合物は、化合物No. 27、28、38、18、17及び37（好ましさが減少する順に並べられている）である。発明の特に好ましい化合物は化合物No. 1、25、29、36、33及び9（好ましさが減少する順に並べられている）である。

## 実施例2

### 阻害定数アッセイ

メチルスルホキシドに10 mMの溶液すなわち阻害剤を作成し、その後HBSで100  $\mu$ Mまで希釈した。得られた100  $\mu$ M溶液の種々の量を100  $\mu$ Mス

ペクトロジム (Spectrozyme) THを含有するHBSに加えた。阻害剤の最終濃度を0, 1, 2, 3, 5, 7, 10及び15  $\mu\text{M}$ とした。APCを5 nMの最終濃度に添加して、基質加水分解の速度を監視した。基質加水分解の転化速度を計算し、図1に示すように阻害剤濃度に対してプロット化した。

200  $\mu\text{M}$ 及び600  $\mu\text{M}$ スペクトロジムTHを用いて実験を繰り返した。最初の実験において、阻害剤及びAPCの濃度は次のようであった。基質加水分解の転化速度を再び阻害剤濃度に対してプロット化した。これら3つのプロットの交点が阻害定数値 (2.1  $\mu\text{M}$ ) を与える。

本発明の化合物のための $K_i$ を以下の表2に示す。

表2

| 化合物     | K <sub>i</sub> : A P C | K <sub>i</sub> : I I a | K <sub>i</sub> : X a |
|---------|------------------------|------------------------|----------------------|
| 化合物 1   | 2. 1 $\mu$ M           | > 5 m M                | 4 0 0 $\mu$ M        |
| 化合物 3   | 3 5 $\mu$ M            |                        |                      |
| 化合物 4   | 1 1 8 $\mu$ M          |                        |                      |
| 化合物 5   | 1 6 0 $\mu$ M          |                        |                      |
| 化合物 6   | 6 5 0 $\mu$ M          |                        |                      |
| 化合物 7   | 5 5 0 $\mu$ M          |                        |                      |
| 化合物 8   | 1 1 5 $\mu$ M          |                        |                      |
| 化合物 9   | 9 0 $\mu$ M            | 1. 5 m M               | 1 5 0 $\mu$ M        |
| 化合物 1 0 | 3 9 $\mu$ M            |                        |                      |
| 化合物 1 1 | 2 8 $\mu$ M            |                        |                      |
| 化合物 1 2 | 2 9 $\mu$ M            |                        |                      |
| 化合物 1 3 | 2 8 0 $\mu$ M          |                        |                      |
| 化合物 1 4 | 1. 6 $\mu$ M           | > 5 m M                | 4 4 0 $\mu$ M        |
| 化合物 1 5 | 1. 8 $\mu$ M           | > 5 m M                | 4 4 0 $\mu$ M        |
| 化合物 1 6 | 1. 3 $\mu$ M           | N I                    | 7 4 0 $\mu$ M        |
| 化合物 1 7 | 2. 3 $\mu$ M           |                        |                      |
| 化合物 1 8 | 1. 1 $\mu$ M           | > 5 m M                | 2 8 0 $\mu$ M        |
| 化合物 1 9 | 1. 5 $\mu$ M           | N I                    | 2 3 0 $\mu$ M        |
| 化合物 2 0 | 4. 5 $\mu$ M           | N I                    | 3 3 0 $\mu$ M        |
| 化合物 2 1 | 1. 2 $\mu$ M           | > 5 m M                | 6 6 0 $\mu$ M        |
| 化合物 2 2 | 8. 8 $\mu$ M           | > 5 m M                | 2. 2 $\mu$ M         |
| 化合物 2 3 | 1 5 $\mu$ M            | N I                    | 1 7 0 $\mu$ M        |
| 化合物 2 4 | 7. 9 $\mu$ M           | 3. 1 m M               | 2 8 0 $\mu$ M        |

同様なバックボーン構造及び変化する保護基(表2)を有する17の化合物(化合物1及び9~24)に関する阻害定数の分析は、これらすべての化合物がA P C及び第X a因子を競合的に阻害することを示す。A P Cのための阻害定数は、化合物1.8における1. 1  $\mu$  Mから化合物1.3における2.8.0  $\mu$  Mまで広範囲

に変化する。これらの定数は、阻害剤のP及びP'構造並びにこれらの構造におけるブロック基の位置に大きく従属することを示す。P構造においてH a r gだけを含む化合物9は、APCの比較的弱い阻害剤であり、比較的高い $K_1$  ( $90 \mu\text{M}$ )を有する。他方、第V/Va因子A r g<sup>306</sup>切断部位の $P_1$ - $P_4$ 構造並びにP'構造のアミノナフタレンベンジルスルホンアミドを含む化合物13は、 $280 \mu\text{M}$   $K_1$ でAPCに対してかなり低い親和性を示す。A r g<sup>306</sup>切断部位の $P_1$ - $P_4$ 、P'<sub>3</sub>、P'<sub>4</sub>構造を含む化合物10~12は、 $28 \mu\text{M}$ ~ $39 \mu\text{M}$ の範囲で $K_1$ を有する。これら3つの阻害剤のすべての官能基は、種々の保護基によって完全にブロックされることを強調することが必要である。ブロック基の選択的な脱離は、合成された阻害剤の効率を増加させる。従って、ブロックされたC-末端カルボキシル機能だけを備えた化合物23及び24は、上述の完全にブロックされたアナログよりも低い $K_1$  (それぞれ $15 \mu\text{M}$ 及び $7.9 \mu\text{M}$ )を有する。さらに、これら2つの化合物(23及び24)の $K_1$ の比較は、芳香族ベンジル基が脂肪族メチル基に

対して望ましいことを示している。APCに対する阻害剤親和性に関するブロック基の影響をさらに分析すると、P構造においてL y sの少なくとも1つのブロックされていない側鎖並びにP'構造において完全にブロックされた官能基を含む化合物は、APCに対する最も高い親和性を有する(化合物1及び14~19)という結論に至る。APCに対するこれらの阻害剤の $K_1$ は、 $1.1 \mu\text{M}$ から $2.3 \mu\text{M}$ まで変化し、ブロックされていない側鎖を備えたL y sの位置( $P_1$ または $P_4$ )によって影響されない(化合物15と19の比較)。さらに、両方のL y s (化合物16~18)の側鎖からの、または、さらにN-末端アミノ基(化合物1)からのブロック基の同時脱離は、APCに対する阻害剤の親和性に重大な変化を生じさせない。しかしながら、両方のL y sの側鎖がブロックされ、 $P_4$ L y sのN-末端アミノ基だけがブロックされていない場合には、阻害剤の $K_1$ は、わずかに上昇する(化合物20;  $K_1 4.5 \mu\text{M}$ )。ベンジル保護基を備えた $P_2$ Th r側鎖のブロックは、APCに対する阻害剤の親和性に影響しない(化合物16と21の比較)。P<sub>1</sub>位置におけるH a r gと $\beta$ -H a r g (化

合物17) またはD-A r g (化合物18) との置換により作成された阻害剤は、最初の化合物16のもの(それぞれ2.3  $\mu$ M, 1.1  $\mu$ M及び1.3  $\mu$ M)と同様な $K_1$ を有する。表2に示すすべての阻害剤は、第Xa因子の弱い阻害剤であり(第Xa因子/APCの

$K_1$ 比は、化合物16のための570ほどに達する)、トロンビンを(ほとんど)阻害しない。

### 実施例3

この組織因子経路のトロンビンに対する実験が、蛋白C(PC)経路の存在下で血液凝固の再構成モデルにおけるトロンビン生成について化合物1及び9の影響を立証するために行われた(図2)。

組織因子(0.5 nM)が、75%ホスファチジルコリン(PC)と25%ホスファチジルセリン(PS)とからなる400  $\mu$ MのPCPS小胞内に入れ、再脂質化した。再脂質化した組織因子を、37℃で20分間HBS(20 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4)において1.0 pMの第VIIa因子とともにインキュベートして、第VIIa因子/組織因子複合体を形成した。他の蛋白は、プラズマ濃度で用いられた。20 nMの第V因子、0.7 nMの第VIII因子及び10 nMのトロンボモデュリン(thrombomodulin)を第VIIa因子/組織因子複合体に加えた。反応は、チモーゲン及び阻害剤混合物: 1.4  $\mu$ Mのプロトロンビン、170 nMの第X因子、90 nMの第IX因子、70 nMのPC及び40  $\mu$ Mの化合物1または9(すべて最終濃度)の添加により開始した。対照実験において、阻害剤は不存在であった。第VIIa因子の最終濃度は0.5 pMであり、組織因子の最終濃度は0.25 nMであった。選択され

た時点で、200  $\mu$ Mクロマトジェニック・基質・スペクトロジウムTHを用いたトロンビン・アミドリティック(amidolytic)活性アッセイのために、5  $\mu$ lのアリコートが取り除かれ、TBS(20 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4)において40 mMのEDTA中にクエンチした。

## 実施例 4

この組織因子経路のトロンビンに対する実験が、APC経路の存在下でかつ第V I I I 因子の不存在下で血液凝固の再構成モデルにおけるトロンビン生成について化合物1及び9の影響を立証するために行われた(図3)。

組織因子(0.5 nM)が、75%ホスファチジルコリン(PC)と25%ホスファチジルセリン(PS)とからなる400  $\mu$ MのPCPS小胞内に入れ、再脂質化した。再脂質化した組織因子を、37℃で20分間HBS(20 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4)において2.5 pMの第V I I a 因子とともにインキュベートして、第V I I a 因子/組織因子複合体を形成した。他の蛋白は、プラズマ濃度で用いられた。20 nMの第V 因子及び10 nMのトロンボモデュリン(thrombomodulin)を第V I I a 因子/組織因子複合体に加えた。反応は、チモーゲン及び阻害剤混合物: 1.4  $\mu$ Mのプロトロンビン、170 nMの第X因子、90 nMの第IX因子、70 nMの蛋白C及び40  $\mu$ Mの化合物1または9(す

べて最終濃度)の添加により開始した。対照実験において、第V I I I 因子は存在したが、阻害剤は不存在であった。第V I I a 因子の最終濃度は1.25 pMであり、組織因子の最終濃度は0.25 nMであった。選択された時点で、200  $\mu$ Mクロマトジェニック・基質・スペクトロジムTIIを用いたトロンビン・アミドリティック(amidolytic)活性アッセイのために、5  $\mu$ lのアリコートが取り除かれ、TBS(20 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4)において40 mMのEDTA中にクエンチした。

## 実施例 5

この組織因子経路阻害剤(TFPI)実験が、TFPIによる第V I I a 因子/組織因子阻害について化合物1及び9の影響を立証するために行われた(図4)。

組織因子(10 nM)が、75%ホスファチジルコリン(PC)と25%ホスファチジルセリン(PS)とからなる200  $\mu$ MのPCPS小胞内に入れ、再脂質化した。再脂質化した組織因子を、37℃で20分間HBS(20 mM HE

PES, 0.15M NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.4)において4nMの第VIIa因子とともにインキュベートして、第VIIa因子／組織因子複合体を形成した。8nMのTFPI及び阻害剤を選択された濃度(0~24μM)で第VIIa因子／組織因子複合体に加え、その混合物を2分間インキュベートし、酵素複体のアミドリティック(amidolytic)

活性を、200μMクロマトジェニック・基質・スペクトロジムXaの加水分解速度により評価した。

#### 実施例6

この組織因子経路インヒビター(TFPI)の実験を行い、TFPIによる第Xa因子に対する化合物(compound)1および9の影響を確立した(図5)。

8nMのTFPIおよび選択された濃度(0~24μM)のインヒビターをIIBS中、4nMの第Xa因子に添加し、混合物を2分間インキュベートし、第Xa因子のアミド分解(amidolytic)活性を200μMの染色体性の基質スペクトロザイムXa(Spectrozyme Xa)の加水分解速度により調べた。

#### 実施例7

トロンビンへの組織因子の経路の実験を行い、TFPIの存在下および第VIII因子の不存在下で、血液凝固の再構成されたモデルでのトロンビンの生成について化合物1および9の影響を調べた(図6)。

組織因子(0.5nM)を75%のホスファチジルコリン(PC)と25%のホスファチジルセリン(PS)から構成された小胞中に入れ再脂質化した。再脂質化された組織因子をIIBS(20mMのHEPES、0.15MのNaCl、2mMのCaCl<sub>2</sub>、pH7.4)中で、2.5pMの第VIIa因子とともに20分、37℃でインキュベートし、第VIIa因子／組織因子複合体を形成させ

た。他のタンパク質は血漿濃度で用いた。20nMの第V因子を第VIIa因子／組織因子複合体に加えた。反応の開始はチモーゲンとインヒビターとの混合物(1, 4μMのプロトロンビン、170nMの第X因子、90nMの第IX因子、2.5nMのTFPI、および4.0μMの化合物1または9(全ての濃度は最終濃

度である) ) を添加することによって行った。対照実験においては、第VIII因子を存在させ、インヒビターは存在させなかった。第VIIa 因子の最終濃度は1. 25 pMで、組織因子の最終濃度は0. 25 nMであった。200  $\mu$ Mの染色体性の基質スペクトロザイムTH (Spectrozyme TH) を用いてトロンビンのアミド分解活性のアッセイを行うために、一定の時間で、5  $\mu$ lのアリコートを取り出し、TBS (20 mMのトリス、0. 15 MのNaCl、pH7. 4) 中の40 nMのEDTAに入れてクエンチした。

#### 実施例 8

トロンビンへの組織因子の経路の実験を行い、APC経路およびTFPIの存在下、第VIII因子が存在しない状態で血液凝固の再構成されたモデルにおけるトロンビンの生成について、化合物1および9の影響を調べた (図7)。

組織因子 (0. 5 nM) を、75%のホスファチジルコリン (PC) および25%のホスファチジルセリン (PS) から構成される400  $\mu$ MのPCPS小胞に入れ再脂質化させた。再脂質化された組織因子をHBS

(20 mMのHEPES、0. 15 MのNaCl、2 mMのCaCl<sub>2</sub>、pH7. 4) 中の2. 5 pMの第VIIa 因子とともに、20分間37℃でインキュベートし、第VIIa 因子/組織因子複合体を形成させた。他のタンパク質は血漿濃度で用いた。2.0 nMの第V因子と1.0 nMのトロンボモデュリンを第VIIa 因子/組織因子複合体に添加した。反応の開始はチモーゲンとインヒビターとの混合物 (1.4  $\mu$ Mのプロトロンビン、170 nMの第X因子、90 nMの第IX因子、70 nMのAPC、2.5 nMのTFPI、および40  $\mu$ Mの化合物1または9、もしくはそれらの両方 (各々20  $\mu$ M) (全ての濃度は最終濃度である) ) を添加することによって行った。対照実験においては、第VIII因子を存在させ、インヒビターを存在させない。第VIIa 因子の最終濃度は1. 25 pMであり、組織因子の最終濃度は0. 25 nMであった。一定の時間に、5  $\mu$ lのアリコートを取り出し、200  $\mu$ Mの染色体性の基質スペクトロザイムTHを用いてトロンビンアミド分解活性アッセイのためにTBS (20 mMのトリス、0. 15 MのNaCl、pH7. 4) 中の4.0 mMのEDTAでクエンチした。トロンビン



の濃度を標準直線から計算した。

#### 実施例 9

トロンビンへの組織因子経路の実験を行い、血液凝固の再構成されたモデルにおいてトロンビンの生成に対する化合物 1、9 および 26 の影響を調べた (図 8)。

組織因子 (0.5 nM) を 75% のホスファチジルコリン (PC) および 25% のホスファチジルセリン (PS) から構成された 400  $\mu$ M の小胞に入れ再脂質化した。再脂質化した組織因子を HBS (20 mM の HEPES、0.15 M の NaCl、2 mM の  $\text{CaCl}_2$ 、pH 7.4) 中の 2.5 pM の第 VIIa 因子とともに、20 分間 37°C でインキュベートし、第 VIIa 因子/組織因子複合体を形成した。他のタンパク質は血漿濃度で用いた。20 nM の第 V 因子と 0.7 nM の第 VIII 因子を第 VIIa 因子/組織因子複合体へ添加した。反応の開始はチモゲンとインヒビターとの混合物 (1.4  $\mu$ M のプロトロンビン、170 nM の第 X 因子、9.0 nM の第 IX 因子、および 40  $\mu$ M の化合物 1、9、もしくは 26 (全ての濃度は最終濃度である)) を添加することによって行った。対照実験としては、インヒビターを存在させなかった。第 VIIa 因子の最終濃度は 1.25 pM であり、組織因子の最終濃度は 0.25 nM であった。一定の時間に 5  $\mu$ l のアリコートを取り出し、200  $\mu$ M の染色体性の基質スペクトロザイム TH を用いるトロンビンアミド分解活性アッセイ用に、TBS (20 mM のトリス、0.15 M の NaCl、pH 7.4) 中、40 mM の EDTA に入れてクエンチした。

図 2 に示した実験結果 (実施例 3) は PC が存在しない条件において (白丸)、トロンビン生成の上昇する相 (explosive phase) が開始の約 2 分後に見られる。プロ

テイン C 経路は開始相を約 10 分間延長し、トロンビン生成の最大速度を減少している (黒丸)。化合物 1 もしくは 9 の存在は、PC 経路の存在を完全に補い、トロンビン生成速度を PC が存在しない場合よりも高い限度にまでシフトする (

三角)。この効果はAPCによる第V a 因子と第VIII a 因子の不活性化の遅れと、凝血カスケードの促進化とにより引き起こされる。

同様の結果が実施例4 (図3) で得られている。第VIII因子が存在しないとき(白丸)、すなわち、血友病Aの状態と同じような状況において、トロンビン生成の上昇する相が約3分ほど遅れる。しかし、化合物1もしくは9が存在するとき、第VIII因子が存在しないことは完全に補われる(ダイヤ型)。さらに、トロンビン生成の上昇する相は、第VIII因子が存在する対照実験よりも早期に生じている(黒丸)。化合物1の存在下および第VIII因子が存在しないとき(白ダイヤ型)のトロンビン生成の最大速度は、対照実験もしくは化合物9が存在するときよりも顕著に大きかった。この化合物1の効果は、化合物9よるものよりもこの化合物のAPCに対するより高い親和性に起因し、従って、APCによる不活性化に対する第V a 因子および第VIII a 因子のより効率的な保護に起因するものである。

第VII a 因子/組織因子複合体および第X a 因子のインビボにおける既知のインヒビターのうちで、TFPI が最も効率的であると思える。下記に示した実験結果は明

確に、TFPI が第VII a 因子/組織因子複合体または第X a 因子により開始される酵素的反応の速度を顕著に遅くさせ、反応を停止さえする、ことを示している。図4および図5に示されたデータは、TFPI の存在下において、第VII a 因子/組織因子複合体(図4、実施例5)や第X a 因子(図5、実施例6)の活性がTFPI が存在しないときに示されるものより数%減少していることを示している。テストした両化合物(#1および#9)は両方の酵素、第X a 因子および第VII a 因子/組織因子複合体に関して濃度依存的にTFPI の影響を減少することができる。それらはTFPI による抑制に対して類似した効率的な保護を示す。従って、第VII a 因子/組織因子複合体のアミド分解活性を50%回復させるのに必要な化合物1の濃度は10  $\mu$  Mであり、化合物9の必要な濃度は11  $\mu$  Mである。両化合物は第X a 因子の保護の場合には効率がよくない。従って、第X a 因子のアミド分解活性を50%回復させるのに必要な化合物1の濃度は2

6  $\mu$ Mであり、一方、このような効率に達するのに必要な化合物9の濃度は26  $\mu$ Mとなる。

実験の複雑性を増加し、TFPIの存在下でトロンビンへの組織因子経路の再構成されたモデルにおいてトロンビン生成を促進する化合物1および9の能力をテストした（実施例7、図6）。この実験の結果は、TFPIがトロンビン生成の上昇する相を遅らせることを示している（白丸）。さらに、第VIII因子が存在しないとき、ト

ロンビン生成の遅れた相（lag phase）が有意に延びており、反応の最大速度は約10倍ほど、対照実験（黒丸）よりも低い。化合物1および9は第VIII因子が存在しないことを補うばかりか、反応が対照実験よりもより早く上昇するトロンビン生成相に達するようにする（三角）。これらのデータはTFPIによる不活性化から系内の酵素や酵素的な複合体を保護することを示している。

実施例8に記載された実験（図7）で、血友病Aの場合にインビボで生じる状況と同じような状況、すなわち凝血カスケードが凝血のアンタゴニストの存在下（TFPIおよびPC経路）で、第VIII因子が存在しない状況で開始される状況（黒丸）を作り出した。これらの条件下で、トロンビン生成は僅かにしか検出できず、30分以内に上昇する相に達することもない。化合物1もしくは9の存在下（三角）またはそれらの等モル混合物（四角）の存在下において、第VIII因子が存在しないことは完全に補われた。反応の遅れた相はTFPIからの酵素の保護により減少し、一方、APCの阻害はトロンビン生成の最大速度を増加する原因となった。

化合物1もしくは9が存在したとき、図2、3、6、7に示された実験におけるトロンビン生成の過度な速度は、これらの化合物が凝血のインヒビターが存在しない系内においてトロンビン生成を増加することができるか否かという疑問を生じる。従って、次のトロンビンへの組織因子経路の実験はプロテインCおよびTFPIが存

在しない条件で行った。図8（実施例9）に示されるデータは、化合物1、9、

および26がトロンビン生成の遅れた相 (lag phase) を減少できることを明確に示している。化合物1および26は、またプロトロンビン活性化の最大速度を上昇することができる。

従って、実施例2～9に示されたデータは、本願発明で示される化合物が以下の理由により潜在的なプロ血液凝固体 (procoagulant) であることを示している。

1. APCの抑制
2. T F P Iからの第VII a 因子／組織因子複合体の保護
3. 凝血カスケードの促進化

#### 実施例10

血しょう凝固実験は、合成された化合物の影響を立証するようにインビボで血しょう凝固時間について行われた (テーブル3)。

一つの試験管内に入れられたクエン酸化された血しょう100  $\mu$  l とHBS 100  $\mu$  l と、別の試験管内に入れられたPCPSで再脂質化された組織因子を含むHBS中の25 mM  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu$  l と選択された合成化合物 (DMSO中で10 mM貯蔵液) とが、37℃で2分間インキュベートされた。二つの試験管の中身は一緒に混ぜ合わされ、血しょう凝固時間は目に見えるように立証された。最終的な反応物質の濃度は、組織因子／PCPS 0.625 nM / 2.5  $\mu$  M、合成化合物4

0  $\mu$  Mである。対照実験において、合成化合物はなく、対応する量のDMSOが存在した。

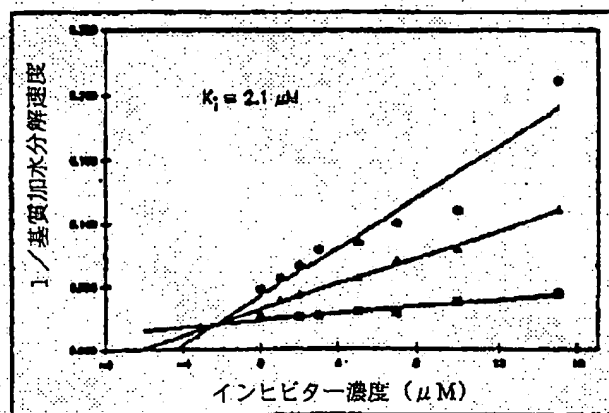
#### 実施例11

血液凝固実験は、合成された化合物の影響を立証するようにインビボで血液凝固時間について行われた (テーブル4)。

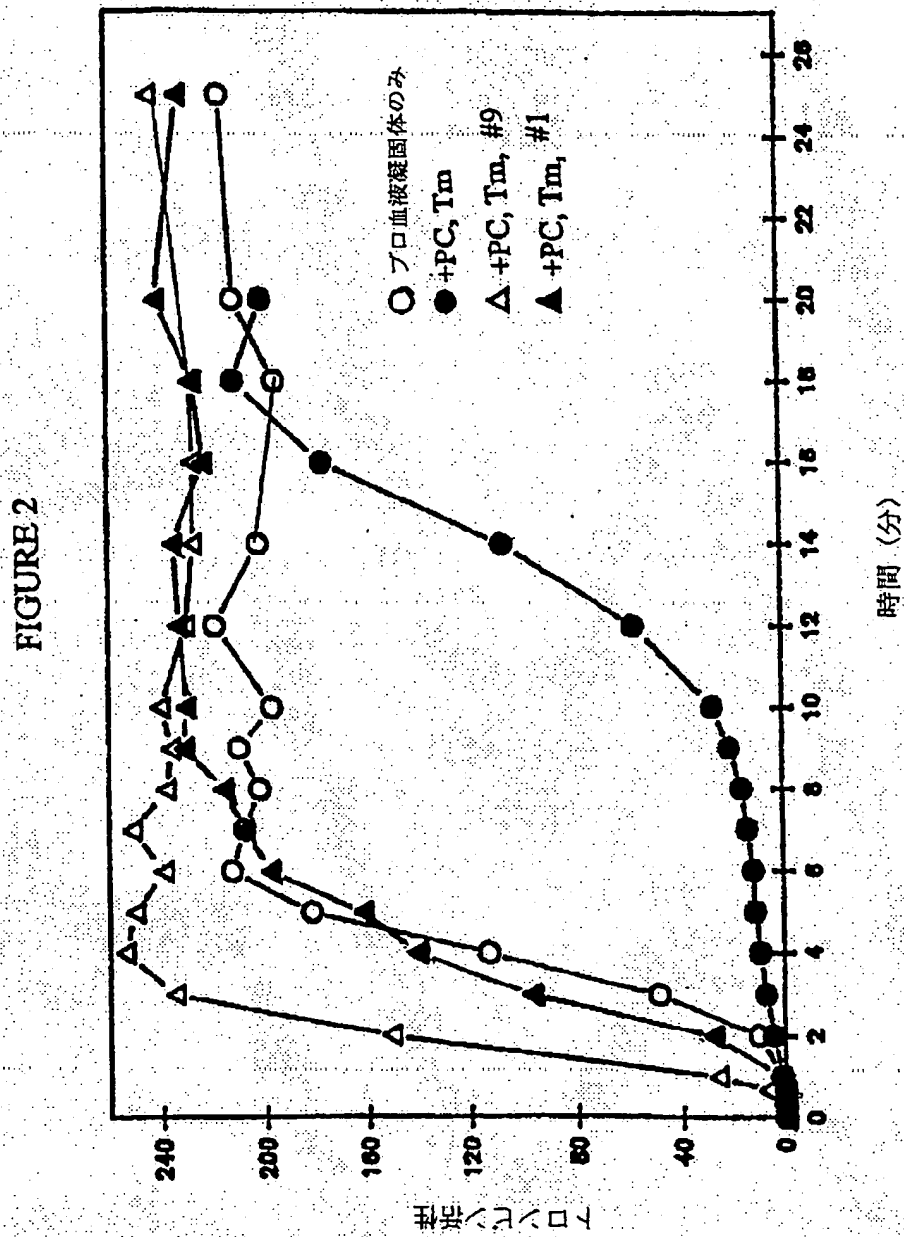
1 ml の新鮮な血液は、コーントリプシン阻害剤50  $\mu$  g / ml と50 nM PCPSで再脂質化された25 pM組織因子と20  $\mu$  M化合物25-27とを含む試験管の中に注入された。血液凝固時間は目に見えるように立証された。対照実験において、化合物はなく、2  $\mu$  l のDMSOが存在した。

【図1】

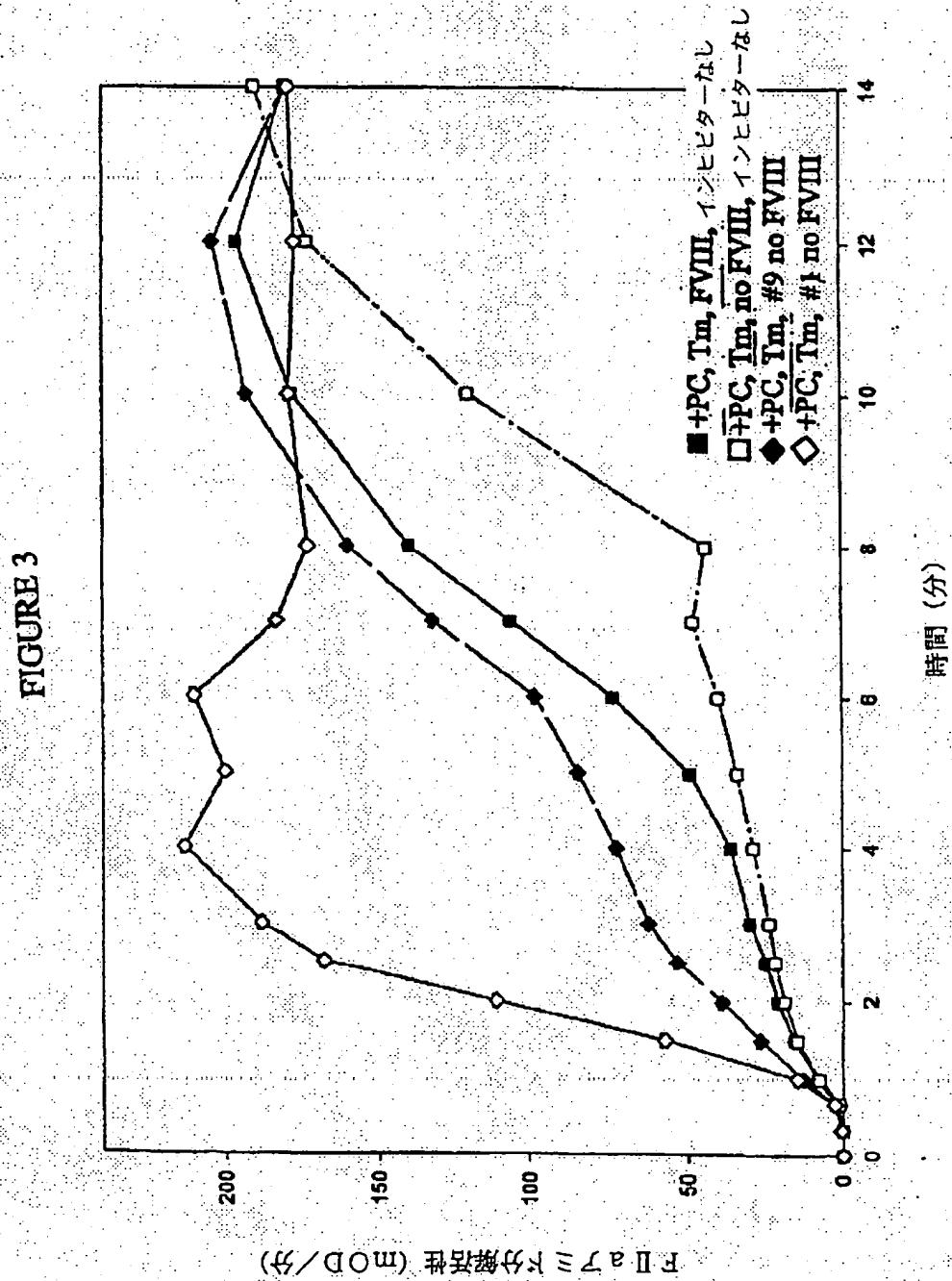
FIGURE 1



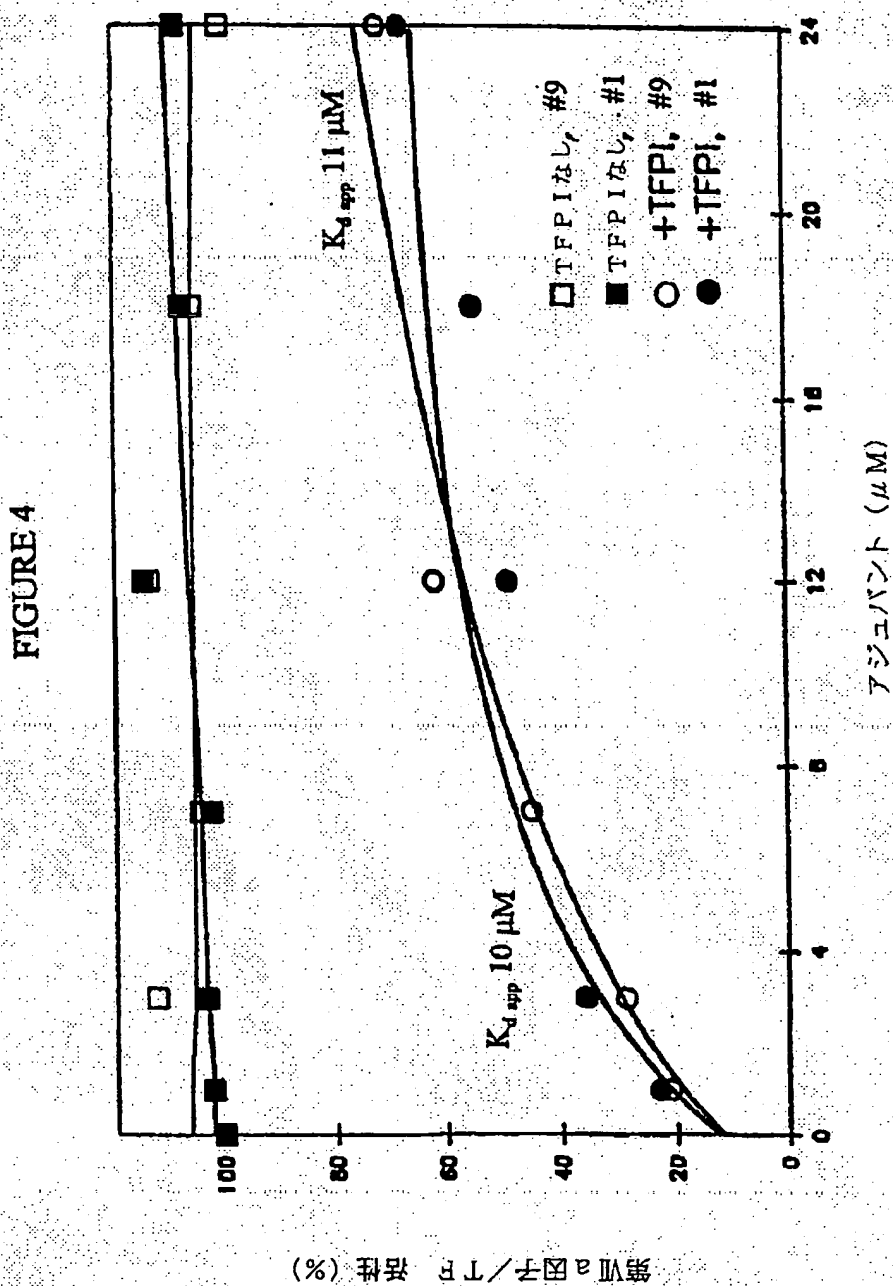
【図2】



【図3】

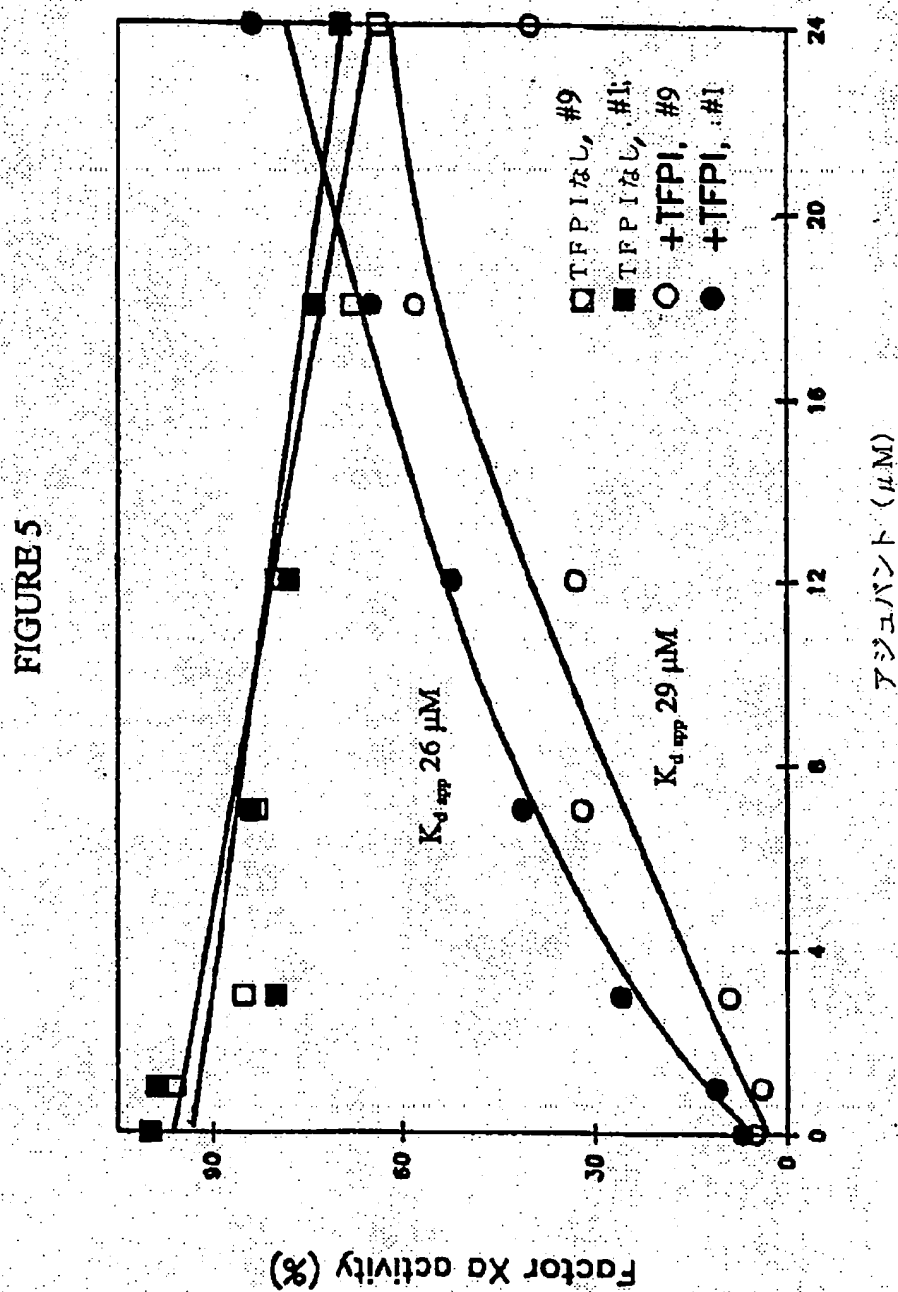


【図4】

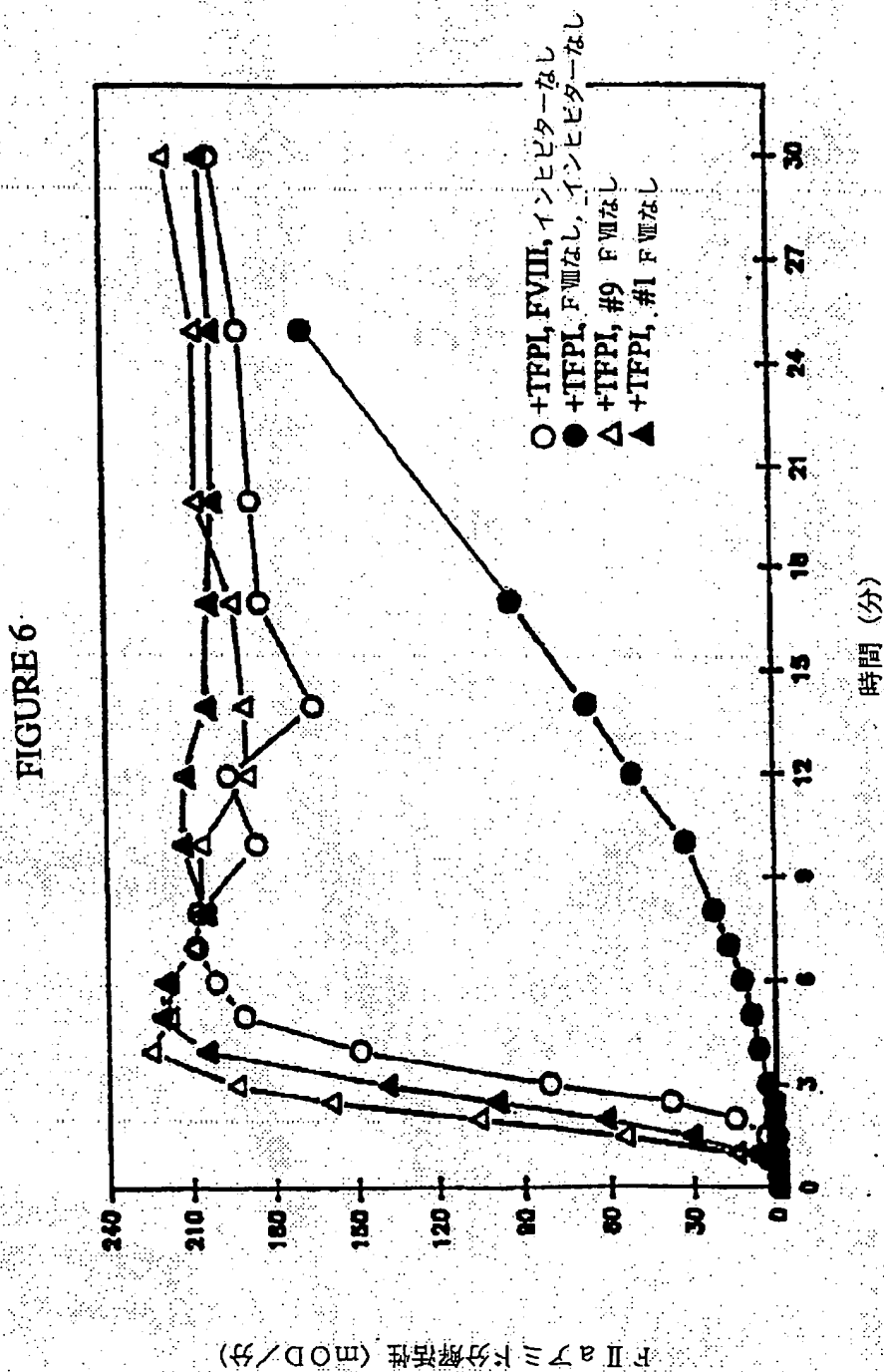




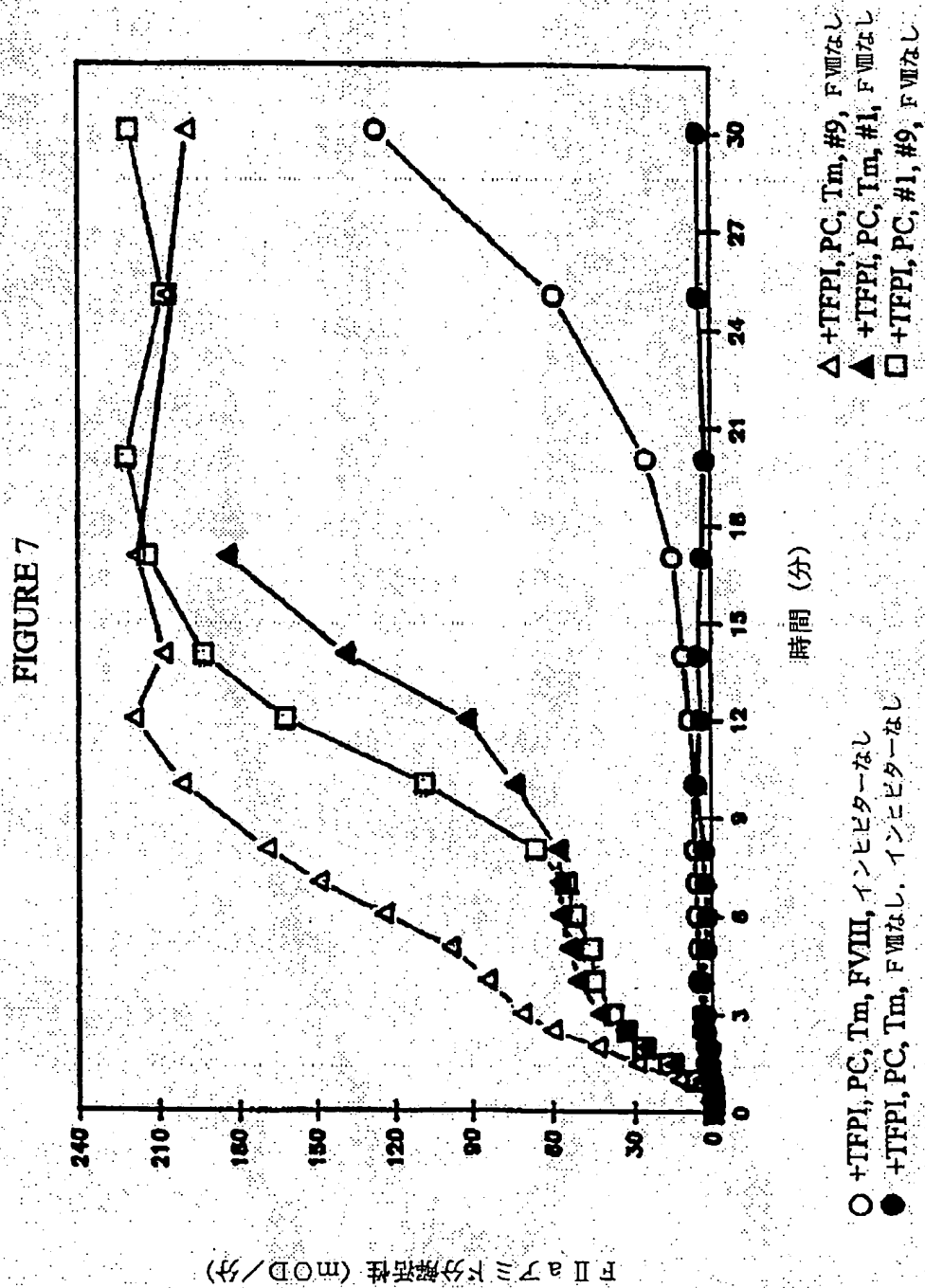
【図5】



【図6】

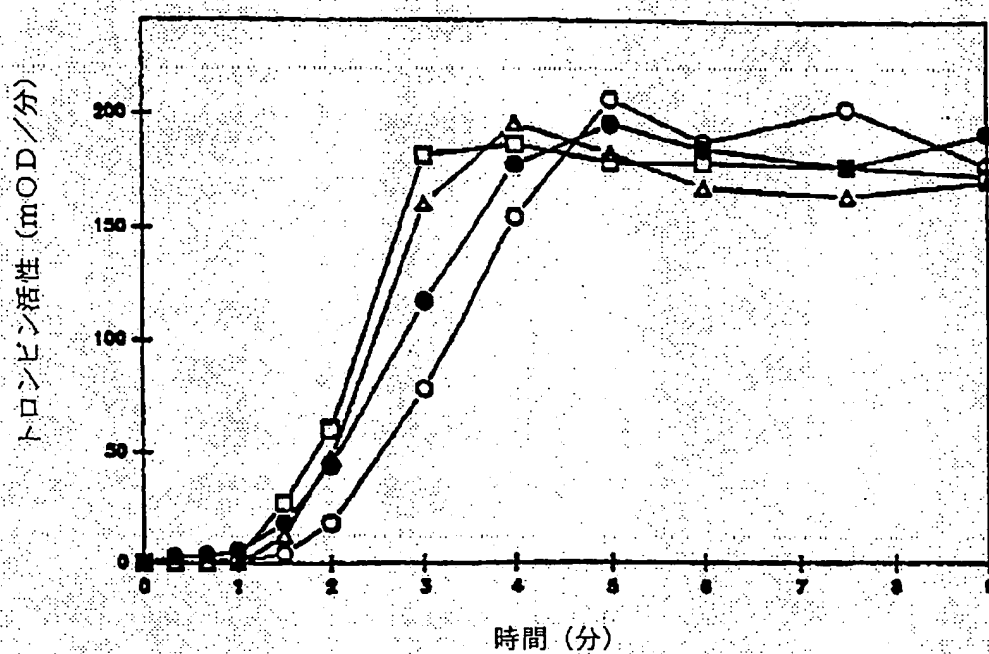


【図 7】



【図8】

FIGURE 8



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US97/21075

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : A61K 38/08

US CL : 530/329

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 530/328, 329, 330, 345

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, CAS Online

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | US 5,399,487 A (BUTENAS et al) 21 March 1995, see entire document.                 | 1-6                   |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

|  |     |   |
|--|-----|---|
| * Special categories of cited documents  | *T  | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention   |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance   | *T* | documents of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| *E* earlier document published on or after the international filing date   | *Y* | documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| *I* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | *A* | document member of the same patent family   |
| *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means   |     |   |
| *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed   |     |   |

Date of the actual completion of the international search

25 FEBRUARY 1998

Date of mailing of the international search report

13 APR 1998

 Name and mailing address of the ISA/US  
 Commissioner of Patents and Trademarks  
 Box PCT  
 Washington, D.C. 20231  
 Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

DAVID LUKTON

Telephone No. (703) 308-0196

## フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72) 発明者 マン、ケネス ジー

アメリカ合衆国 05458 ヴァーモント州

グランデ アイル イースト ショーア

ロード サウス 72